

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Oktober 2003 (16.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/084568 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 39/39

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03497

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. April 2003 (03.04.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
02007640.2 4. April 2002 (04.04.2002) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): GBF GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLO-
GISCHE FORSCHUNG MBH [DE/DE]; Mascheroder
Weg 1, 38124 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GUZMAN, Carlos,
Alberto [IT/DE]; Mancinusweg 43, 38304 Wolfenbüttel
(DE). MÜHLRADT, Peter [DE/DE]; Schubertstrasse 5,
38114 Braunschweig (DE).

(74) Anwalt: LÄUFER, Martina; Grammi, Lins & Partner
GbR, Freundallee 13, 30173 Hannover (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,

GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

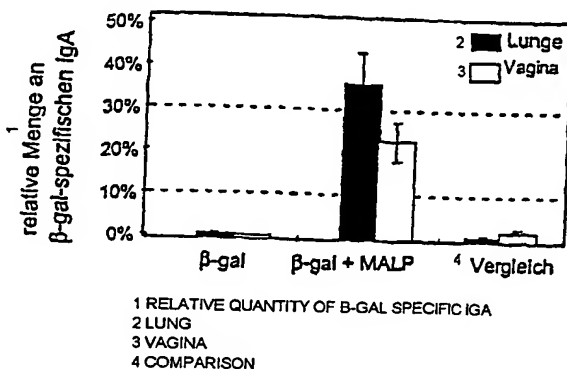
Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die
folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: USE OF A LIPOPEPTIDE OR LIPOPROTEIN AS AN ADJUVANT IN THERAPEUTIC OR PROPHYLACTIC VAC-
CINATIONS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES LIPOPEPTIDS ODER LIPOPROTEINS ALS ADJUVANS BEI THERAPEUTI-
SCHER ODER PROPHYLAKTISCHER VAKZINIERUNG



(57) Abstract: Disclosed is the use of lipopeptides and
lipoproteins as mucosal adjuvants for various vaccinations
via mucous membranes, particularly intranasally. Said
lipopeptides represent peptides or proteins substituted
with 2,3-diacyloxy(2R)-propyl at the amino-terminal
cystein of a peptide or protein, preferably S-(2,3-bis-
palmitoyloxy-(2R)-propyl)cysteinyl peptides derived from
mycoplasmas. Said peptides are highly effective even in
small doses, produce good immunization results, and increase
the IgA level, among others.

(57) Zusammenfassung: Es wird die Verwendung von
Lipopeptiden und Lipoproteinen als mukosale Adjuvantien
für verschiedenste Vakzinierungen über die Schleimhäute
vorgeschlagen, insbesondere auf intranasalem Wege. Bei
den Lipopeptiden handelt es sich um an der aminoterminalen
abgeleitete S-(2,3-bispalmitoyloxy-(2R)-propyl)cysteinyl-peptide. Die angegebenen Peptide sind bereits in geringen Dosen
hochwirksam und führen zu guten Immunisierungsergebnissen und Erhöhung u.a. des IgA Spiegels.

WO 03/084568 A2



IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG)

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

12/PRts

10/509917

- 1 -

Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins als Adjuvans bei therapeutischer oder prophylaktischer Vakzinierung

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins als
5 Adjuvans bei therapeutischer oder prophylaktischer Vakzinierung, insbesondere
über die Schleimhäute, d.h. als Mucosal-Adjuvans.

Ein Drittel aller jährlichen Todesfälle in der Welt werden noch immer durch
Infektionskrankheiten verursacht, die außerdem für wenigstens 15 % der
10 Krebsneuerkrankungen verantwortlich sind. Infektionskrankheiten sollen ferner in
die Pathophysiologie verschiedener chronischer Krankheiten entzündlicher,
vaskulärer oder degenerativer Art verwickelt sein. Infektionskrankheiten
verursachen der Allgemeinheit hohe Kosten durch Behandlungskosten und
Arbeitsausfall der Erkrankten.

15

Zur Abwehr von Infektionskrankheiten werden generell zwei Wege verfolgt, nämlich
Therapie und Prophylaxe. Hierbei sind Impfungen zur wirksamsten Waffe gegen
Infektionskrankheiten geworden. Es gibt jedoch noch viele Infektionskrankheiten, für
die noch keine Vakzine zur Verfügung stehen oder eine hinreichende
20 Immunisierung nicht erreicht werden kann. Viele Vakzine sind unzureichend wegen
geringer Effizienz, schweren Nebenwirkungen, geringer Stabilität oder hoher
Kosten. Es besteht daher ein starkes Bedürfnis für neue und verbesserte Impfstoffe
(Vakzine).

25 Traditionell wurden Vakzine für die Prophylaxe bei Infektionskrankheiten
angewendet und sind auf diesem Gebiet für viele Krankheiten gut eingeführt.
Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass Vakzinierungen außerdem ein sehr
geeignetes Mittel bei der Immuntherapie anderer ansteckender Krankheiten sind,
bei denen bisher noch nicht geimpft wurde, wie viraler Hepatitis, Helicobacter-pylori-
30 Infektionen, Herpesvirus-Infektionen usw.. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die
Einbindung von Vakzinen bei Immuntherapien und Immunprophylaxen gegen
Autoimmunkrankheiten, Entzündungskrankheiten, Tumoren, Allergien und zur
Empfängnisverhütung bei Mensch und Tier. Teilweise (insbesondere auch im
letztgenannten Fall) scheint die Verwendbarkeit von Vakzinen an einen effizienten

- 2 -

mukosalen Verabreichungsweg und die damit verbundene Erzeugung einer guten mukosalen Immunreaktion gebunden zu sein.

Die meisten Infektionen sind entweder auf die Schleimhäute beschränkt oder die
5 Krankheitsauslöser müssen während früher Infektionsphasen die Schleimhaut passieren. Es ist daher unbedingt anzustreben, dass bei einer Vakzinierung nicht nur eine systemische sondern vor allem auch eine mukosale Immunantwort erhalten wird, um hierdurch sowohl die Infektion (Kolonisierung) als auch die Ausbildung der
10 Krankheit primär zu stoppen. Eine gute mukosale Immunantwort würde die Ansteckungsgefahr deutlich herabsetzen.

Dadurch dass sich das systemische und das mucosale Immunsystem zwar teilweise überlappen, aber nicht identisch sind, sind parenteral verabreichte Vakzine für den Schutz gegen mucosal Pathogene weniger wirksam (McGhee, Mestecky et al., "The
15 mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development", Vaccine 10, 75-88 (1992)). Tatsächlich stimulieren parenteral verabreichte Vakzine im wesentlichen systemische Immunantworten, während auf mukosalem Weg, d.h. über die Schleimhäute, verabreichte Vakzine die Immunantwort nachbilden, wie sie durch natürliche Infektionen hervorgerufen wird. Auf diese Weise führt die mukosale
20 Immunisierung zu wirkungsvollen systemischen und mukosalen Immunantworten.

Weiterhin ist zu erwarten, dass die mukosale Verabreichung von Vakzinen weniger Nebenwirkungen mit sich bringt und bei den Patienten gut akzeptiert wird. Auf mukosalem Weg sind Vakzine leichter zu verabreichen und besser in
25 Übereinstimmung mit Vakzinierungsprotokollen zu bringen. Ihre Bereitstellung ist mit geringeren Kosten verbunden.

Die Verabreichung von Antigenen auf mukosalem Weg ist bisher mit einigen beträchtlichen Schwierigkeiten verbunden. Ein Hauptproblem besteht darin, dass
30 die so verabreichten Antigene häufig kaum immunogen sind. Dies beruht auf unterschiedlichen Mechanismen wie (i) beschleunigte Antigen-Eliminierung durch nicht-spezifische Clearance-Mechanismen des Wirts (beispielsweise Zilienaktivität, Peristaltik), (ii) Antigen-Abbau durch lokal wirkende Enzyme, (iii) Antigen-Veränderung und/oder strukturelle Modifizierung infolge extremer pH-Werte (saures

- 3 -

Milieu im Magen, alkalisches im Intestinaltrakt), (iv) schwache Antigen-Durchlässigkeit der Schleimhäute sowie (v) nur sehr begrenzter Zugang zu Antigen-präsentierenden Zellen.

- 5 Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten werden verschiedene Strategien angewendet, z.B., Einschluss oder Assoziation der Antigene mit Partikeln (Mikropartikeln, Nanopartikeln, Bakterien oder Bakterienfragmenten) als Trägern, Verwendung virenartiger Konstrukte, Verwendung von Liposomen oder ISCOMS (immunstimulatorische Komplexe) oder Virosomen, Verwendung transgener
- 10 Pflanzen, Antigen-Produktion durch abgeschwächte virale oder bakterielle Träger, entweder als übliche Vektoren oder als Träger für Nukleinsäure-Vakzine und/oder die Verabreichung dieser Hilfsmittel mit mukosalen Adjuvantien. Trotz intensiver Bemühungen auf diesem Gebiet sind bisher praktisch keine hinlänglich wirksamen und gleichzeitig gut verträglichen mukosalen Adjuvantien zur Praxisreife geführt
- 15 worden.

- Als "Adjuvantien" werden Substanzen bezeichnet, die bei einer Immunisierung dem eigentlichen Antigen (d.h. der Substanz, die die gewünschte Immunreaktion provoziert) beigefügt werden, um die humorale und/oder zellvermittelte
- 20 Immunantwort zu verstärken ("Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie", 1. Band, Spektrum Akademischer Verlag¹⁹⁹⁵) Die Verwendung vieler Adjuvantien beruht allein auf Erfahrung, wobei die Wirkung weder genau zu erklären noch vorauszusagen ist. Traditionell werden vor allem folgende Gruppen von Adjuvantien verwendet: Aluminiumhydroxid, Emulsionen von Mineralölen, Saponine,
- 25 Detergentien, Siliziumverbindungen, Thioharnstoff, Endotoxine gramnegativer Bakterien, Exotoxine grampositiver Bakterien, abgetötete Bakterien oder deren Teile.

- Die Verwendung optimaler Adjuvantien spielt bei der Vakzinierung eine
- 30 entscheidende Rolle. Ohne Adjuvans verabreichte Antigene vermitteln nur selten eine ausreichende Immunantwort. Darüberhinaus kommt es nicht nur auf die Stärke der hervorgerufenen Immunantwort an, sondern auch auf ihre Qualität. Die Stimulierung eines falschen Immunisierungsmusters kann zu immunopathologischen Reaktionen und Verschlechterung der Infektionssymptome

- 4 -

führen. In diesem Zusammenhang kann das Adjuvans helfen, die gewünschte Immunreaktion zu unterstützen.

Die für den Menschen zugelassenen Adjuvantien sind begrenzt. Eines der wenigen
5 von den Zulassungsbehörden für den Menschen akzeptierten Adjuvantien ist
Aluminiumhydroxid. Aus der Tatsache, dass ein Adjuvans bei systemischer
Applikation aktiv ist, also die Wirkung eines Antigens unterstützt, lässt sich nicht
darauf schließen, dass dies auch für andere Applikationswege gilt. Ein typisches
Beispiel ist das Aluminiumhydroxid, welches die Immunogenität einer Substanz bei
10 intramuskulärer, subkutaner, intraperitonealer oder intradermaler Gabe unterstützen
kann, das jedoch bei mukosaler Gabe vollständig unwirksam bleibt.

In den letzten Jahren ist intensiv nach neuen Adjuvantien, auch solchen für den
mukosalen Verabreichungsweg, gesucht worden. Nur wenige Stoffe wurden
15 gefunden, die in der Lage sind Mukosalantworten zu verstärken. Unter diesen
wirken einige als Träger, an die die Antigene gebunden oder mit diesen fusioniert
werden müssen. Weit weniger wurden universell einsetzbare "echte" Adjuvantien
gefunden, die den Antigenen zugemischt werden.

20 Als echte Mukosal-Adjuvantien wurden das hitzeinstabile Toxin aus *Escherichia coli*
und das Cholera toxin aus *Vibrio cholerae* entdeckt. Von beiden wurde eine
Wirksamkeit als Mukosal-Adjuvans beschrieben (Holmgren et al, "Cholera toxin and
cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector system", Vaccine
1179-1184, 1993 und Douce et al, "Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin
25 lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants", Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 92, 1644-1648). Die ihnen innewohnende Toxizität und die
potentiellen Nebenwirkungen beeinträchtigen jedoch ihre Verwendbarkeit im
Zusammenhang mit Vakzinierungen beim Menschen. Obwohl auf gentechnischem
Wege nicht-toxische Derivate dieser Moleküle erzeugt wurden, werden noch immer
30 starke, nicht tolerierbare Nebenwirkungen berichtet, wie krankhafte Veränderungen
der Respirationsschleimhaut und Eindringen des Toxins in das Gehirn (N. Garçon,
Präsentation auf dem "World Vaccine Congress", Genf, 26. bis 28. September 1999;
und: van Ginkel, F.B. et al., "cutting edge: The Mucosal Adjuvant Cholera Toxin

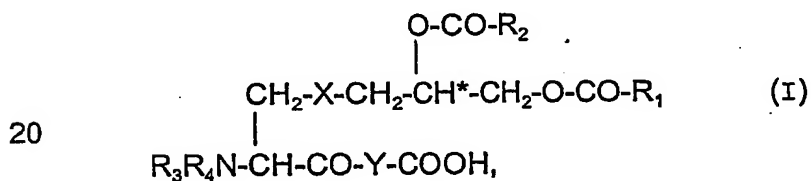
- 5 -

Redirects Vaccine Proteins into Olfactory Tissues", J. Immunol. 2000, 165, 4778-4782).

Es besteht daher noch immer ein dringendes Bedürfnis für neue verträgliche und
5 effektive Mukosal-Adjuvantien.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, eine Palette neuer, hochwirksamer
und für den Menschen nicht-toxischer Mukosal-Adjuvantien zu entwickeln, die mit
den verschiedensten zu unterstützenden aktiven Bestandteilen in herkömmlichen
10 oder neuartigen Vakzinen, wie insbesondere prophylaktischen oder therapeutischen
Impfstoffen einschließlich Krebs- und DNA-Vakzinen, einsetzbar sind.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird die Verwendung eines Lipopeptids oder
Lipoproteins der Struktur (I) als Mukosal-Adjuvans bei therapeutischer oder
15 prophylaktischer Vakzinierung über die Schleimhäute vorgesehen,



wobei

R₁ und R₂, die gleich oder voneinander verschieden sein können, für C₇₋₂₅-
25 Alkyl, C₇₋₂₅-Alkenyl oder C₇₋₂₅-Alkynyl,

X für S, O oder CH₂,

R₃ und R₄ unabhängig voneinander für H oder Methyl und

Y für eine aus 1 bis 25 Aminosäureresten bestehende physiologisch
verträgliche und in der verwendeten Spezies nicht per se immunogene
30 Aminosäuresequenz stehen,

und das mit * markierte asymmetrische Kohlenstoffatom die absolute R-
Konfiguration hat, wenn X = S (Schwefel) ist, gemäß der Regel von Cahn-
Ingold-Prelog.

- 6 -

Zwar wurde in der DE 19652586 A1 bereits die Verwendung eines bestimmten S-(2,3-Dihydroxypropyl)-cystein-peptids mit zwei esterartig an die Dihydroxypropylgruppe gebundenen Fettsäuren als Vakzin-Adjuvans miterwähnt, jedoch rein hypothetisch und ohne Bezug auf Mukosaladjuvantien, so dass von einer üblichen Vakzinierungsroute auszugehen ist.

Vorzugsweise ist die carboxyterminal an die 2,3-diacyloxypropyl-substituierte Aminosäure gebundene Aminosäuresequenz (Y) ausgewählt aus folgenden Sequenzen:

- 10 a) GQTNT,
- b) SKKKK,
- c) GNNDESNISFKEK oder
- d) GQTDNNSQSAAPGSGTTNT.

15 Derzeit besonders bevorzugt ist ein S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2R)-propyl]cysteinyl-peptid, wobei die Peptidkette wiederum eine aus 1 bis 25 Aminosäuren bestehende physiologisch verträgliche, in der verwendeten Spezies nicht per se immunogene Aminosäuresequenz sein kann.

20 Nach derzeitiger Erkenntnis könnte die carboxyterminale Peptidkette eine die Hydrophilizität oder Lipophilizität des Lipopeptids steuernde und gegebenenfalls modifizierende Funktion haben, so dass generell alle Peptid- oder Proteinketten, die - je nach Einsatzzweck der Vakzine - dieses Kriterium erfüllen, verwendet werden können. Die Peptidkette soll physiologisch verträglich und insbesondere nicht selbst
25 in der verwendeten Spezies (d.h. der geimpften (vakzinierten) Spezies, ob Mensch oder Tier) immunogen sein.

Als entscheidend für die Wirksamkeit als Mukosal-Adjuvans wird derzeit die Struktur gemäß Formel (I) angesehen, wobei dem asymmetrischen Zentrum an der
30 bezeichneten Stelle eine zentrale Bedeutung zuzukommen scheint.

Das erfindungsgemäße Mukosaladjuvans kann mit allen dem Fachmann bekannten Methoden an das für die Vakzinierung vorgesehene Antigen oder aktive Molekül gebunden, gemeinsam mit diesem in physikalische (z.B. Micropartikel, Nanopartikel,

- 7 -

Liposomen, ISCOMS, Polymere) oder biologische Partikel (Bakterien, Bakterienteile) oder Virosomen inkorporiert oder mit dem Antigen gemischt werden. Bei der Bindung an Träger können auch Transportmoleküle oder Transportproteine als Träger vorgesehen sein.

5

Vorzugsweise liegt das erfindungsgemäß verwendete Lipoprotein oder Lipopeptid gemäß der o.a. Formel (I) in einer Zubereitung mit der aktiven Vakzinierungskomponente (z.B. dem Antigen) vor, die für intranasale, intra-NALT (nasal associated lymphoid tissue), aerosolisiert, orale, intrarektale, conjunctivale, 10 intravaginale, intraurethrale Applikation oder für die Applikation in die Milchgänge der weiblichen Brust geeignet und vorgesehen ist. Alternativ kann das erfindungsgemäße Mukosal-Adjuvans in einem Kit für die Co-Applikation mit einem Vakzin auf einem der vorgenannten Wege vorliegen und gegebenenfalls hierfür angepasst sein.

15

Das Lipopeptid oder Lipoprotein nach der Erfindung wird insbesondere synthetisch erhalten. Erfindungsgemäße Lipopeptide könnten auch mit auf dem Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren aus einem Mykoplasma-Klon und besonders vorteilhaft aus einem *Mykoplasma-fermentans*-Klon erhalten werden. Die 20 erfindungsgemäßen Lipopeptide werden auch als MALP, nämlich als "macrophage-activating lipopeptides" bezeichnet. Hierzu zählen verschiedene Varianten, von denen MALP-2 ein 2kDa-Lipopeptid gemäß Formel (I) mit $Y = \text{GNNDESNISFKEK}$; $R_3, R_4 = \text{H}$ und $R_1, R_2 = \text{Palmitoyl(C15)}$ ist (S-(2,3-bispalmitoyloxypropyl)-cysteinyln-GNNDESNISFKEK).

25

Die Synthese der erfindungsgemäßen Lipopeptide und -proteine kann vorteilhaft nach der Vorschrift in "Synthesis of N_α -Fmoc protected derivatives of S-(2,3-dihydroxypropyl)-cysteine and their application in peptide synthesis", J.W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, G. Jung in: Int. J. Peptide Proteine Res. 38, 1991, 545-554" 30 durchgeführt werden. Dort werden allerdings die den natürlichen (beispielsweise aus einem Mykoplasma-Klon enthaltenen) entsprechenden Lipopeptide irrtümlich als S-konfiguriert bezeichnet, obwohl dieselben Verbindungen gemäß der international gültigen Nomenklatur nach Cahn-Ingold-Prelog als R-konfiguriert bezeichnet werden müssten (siehe z.B. D. Chapman in "Introduction to Lipids", Mc

- 8 -

Graw-Hill, London, 1969, S. 67 zu "Phosphoglycerides"; Burgos et al. J. Org. Chem. 1987, 52 4973-4977; Morr et al. Eur. J. Immunol. 2002, 32:3337-3347).

5 In Weiterbildung der Erfindung kann das Lipopeptid oder Lipoprotein in einer Zubereitung mit wenigstens einem weiteren Adjuvans und/oder Antigen vorliegen. Insbesondere kann es mit ein oder mehreren entzündungshemmenden, anti-angiogenen, cytotoxischen oder immunmodulatorischen Stoffen oder Liganden (z.B. Chemokinen, Cytokinen, CD40-Ligand) oder mit Antikörpern gemeinsam verabreicht oder in einer Zubereitung mit diesen gegeben werden.

10

Das Lipopeptid oder Lipoprotein kann auch, wie oben bereits angesprochen, mit einem physikalischen oder biologischen Träger assoziiert oder verbunden sein. Es kann weiterhin in einer Zubereitung mit weiteren Zusatz- und Hilfsstoffen, insbesondere Konservierungsstoffen oder Stabilisatoren enthalten sein und
15 eingesetzt werden.

Die Erfindung stellt einen großen Fortschritt bei den Bemühungen zur Bereitstellung effektiver Mukosal-Adjuvantien dar: Das Lipopeptid kann im Rahmen der Formel (I) modifiziert und damit in seiner qualitativen und quantitativen Wirksamkeit variiert
20 und an die gewünschte Verwendung angepasst werden. Es ist vergleichsweise kostengünstig herstellbar und für den Menschen nicht toxisch. Vergleichsweise geringe Bemischungsmengen genügen in den meisten Fällen für deutliche Verstärkungseffekte. Die erfindungsgemäßen Lipopeptide sind in ihren chemischen und biochemischen Eigenschaften gut charakterisiert und besonders auf
25 synthetischem Wege genügend rein erhältlich (Mühlradt, P.F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, G. Jung (1997), Isolation, structure, elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from Mycoplasma fermentans acting at picomolar concentration"; J. Exp. Med. 185: 1951; and Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawal, K. Hoshino, M. Morr, P.F. Mühlradt, and S. Akira (2000);
30 "Cutting edge: Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2-and MyD88-dependent signaling pathway"; J. Immunol. 164:554), schwerwiegende Nebenwirkungen sind daher nach derzeitiger Kenntnis nicht zu erwarten.

- 9 -

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, dass bei Immunisierungen unter Beimischung des erfindungsgemäßen Mukosal-Adjuvans hohe Konzentrationen an IgA in den Schleimhautsekreten behandelter Versuchstiere gefunden wurden. Diese Antikörperspezies ist für den Schutz der Schleimhäute vor Infektionen von besonderer Bedeutung.

Da derzeit überhaupt keine wirksamen Adjuvantien für die intranasale Immunisierung bei humanen Patienten zugelassen sind, stellt die Erfindung einen bedeutenden medizinischen Fortschritt auf diesem Gebiet dar.

10

Die in dieser Erfindung beschriebenen Lipopeptide oder Lipoproteine der allgemeinen Struktur (I) lassen sich auch generell, d.h. auf anderen Wegen als dem mukosalen, als Adjuvantien verwenden, einschließlich besonderer Applikationen für DNA-Vakzine und Krebsvakzine, Vakzine gegen nicht infektiöse Krankheiten und dergleichen, wobei die vorbekannten MALP-2-Peptide, nämlich S-(2,3-Diacyloxypropyl)cystein-peptide der Sequenz DhcGNNDESNISFKEK, wobei N-terminal die Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sein können, für die üblichen Vakzinierungswege (intramuskulär, subkutan, intradermal, intraperitoneal) ausgenommen werden.

20

Die erfindungsgemäßen Adjuvantien lassen sich mit den verschiedensten Antigenen zu Impfstoffen kombinieren. Als Antigene können insbesondere Zielantigene für die Prophylaxe und Behandlung von Infektionskrankheiten, Tumoren, Autoimmunkrankheiten, Allergien sowie chronischer oder akuter entzündlicher Krankheiten ausgewählt werden. Die Auswahl kann u.a. aus dem Antigen-Pool von Infektionserregern wie Viren, Bakterien, Parasiten, Rickettsia, Mycoplasma, Pilzen und dergleichen erfolgen. Unter einer Impfung wird auch eine Behandlung mit Antigenen zur Fertilitätskontrolle in menschlichen oder tierischen Populationen verstanden.

30

Die aus den Beispielen zu entnehmenden vorteilhaften Eigenschaften des erfindungsgemäßen Mukosal-Adjuvans' lassen sich aus keiner Veröffentlichung vor dieser Anmeldung ableiten.

Methodischer Ansatz für die Experimente/Untersuchungen

Im Vorfeld wurden zunächst in vitro-Screening Studien durchgeführt, um das Potential der untersuchten Lipopeptide bezüglich der Aktivierung antigenpräsentierender Zellen abschätzen zu können. Als Zielzellen wurden knochenmarkstämmige dendritische Zellen verwendet, die aus Vorläufern mit Hilfe von GM-CSF erhalten wurden. Ganz im Gegensatz zu dem, was aufgrund der Aktivität von MALP -2 gegenüber Makrophagen erwartet werden konnte, zeigte MALP-2 nur schwache Aktivität gegenüber primären dendritischen Zellen. Im Vergleich mit den Kontrollproben, die im Beisein von E. coli Lipopolysacchariden (LPS, 10 ng/ml) inkubiert worden waren, wurde eine sehr schwache Aktivierung dendritischer, mit 5 ng/ml MALP-2 behandelter Zellen beobachtet.

Aufgrund dieser Voruntersuchungen konnte für MALP-2 und entsprechende Lipopeptide keine Eignung als Adjuvans erwartet werden, da von Adjuvantien eine gewisse Fähigkeit zur Aktivierung dendritischer Zellen vorausgesetzt wird. Dendritische Zellen sind die Hauptgruppe antigenpräsentierender Zellen überhaupt. Sie spielen bei der primären Immunantwort eine zentrale Rolle, wobei sie (1.) die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen darstellen, (2.) die wichtigste Epitopenquelle für spezifische T-Zellen Klone sind, und (3.) die wichtigsten Aktivatoren ruhender T-Zellen sind, welche primäre Immunantworten *in vivo* hervorrufen können. Während mit LPS behandelte dendritische Zellen eine starke Hochregulierung bzw. Vermehrung von CD40 einschließlich CD80 und CD86 zeigen, kann bei MALP-2 behandelten dendritischen Zellen wenn überhaupt, dann nur ein schwacher Effekt bemerkt werden.

Dies war teilweise zu erwarten und in Übereinstimmung mit den an Makrophagen erhaltenen Ergebnissen. Dort war gefunden worden, dass nach einer anfänglichen Hochregulierungsphase bei anhaltender Behandlung mit MALP-2 ein erhöhter Umsatz und verringerte Expression von MHC Klasse II Molekülen, die für die richtige Antigen Präsentation wesentlich sind, auftrat (M. Frisch et al., Eur. J. Immunol. (1996) 26, 1050-1057). Desto überraschender ist die gefundene Wirkung des Adjuvans.

- 11 -

Die Ergebnisse der Vorversuche sprachen daher zunächst stark gegen eine mögliche Aktivität der hier untersuchten Lipopeptide und -proteine als Adjuvantien.

Obwohl diese *in vitro* Studien nahelegten, dass die fraglichen Lipopeptide hier keine
5 Erfolge versprachen, wurden sie als negative Kontrollproben, nämlich als schlecht wirkende Beispiele Makrophagen-aktivierender Substanzen, in *in vivo* Studien der Erfinder mit einbezogen, da die Substanzen aus früheren Versuchen vorhanden waren.

10 Überraschender Weise, da in völligem Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen, wurde gefunden, dass beispielsweise MALP-2 bei Gabe zusammen mit dem Modell-Antigen β -Galaktosidase auf entweder intranasalem (i.n.) oder intraperitonealem (i.p. (Anmerkung: im Tiermodell)) Weg in einer Dosis von nur 0,5 μ g pro Tier pro Dosis die β -Galactosidase-spezifischen IgG-Serumtiter um das 675 bis 3560-fache
15 (i.n.) bzw. das 64 bis 128-fache (i.p.) heraufsetzen konnte. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Lipopeptide können bereits nach der Erstimmunisierung annähernd maximale IgG Antworten hervorgerufen werden, und diese IgG Titer entsprechen denen bei Gabe von 10 μ g (dreimolarem Überschuss) Cholera-Toxin Untereinheit B (CTB), einem gut charakterisierten mukosalen Adjuvans. Ähnliche
20 Ergebnisse werden bei intradermaler oder subkutaner Verabreichung der erfindungsgemäßen Lipopeptide und -proteine gefunden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Gabe der erfindungsgemäßen Lipopeptide und -proteine in wenigstens 3fach geringerer (molarer) Konzentration verglichen mit herkömmlichen Adjuvantien erfolgen kann und sollte.

25

Es konnte auch gezeigt werden, dass die Verabreichung der erfindungsgemäßen Lipopeptide auf intranasalem Wege zu einer wirksamen Stimulierung des mukosalen Immunsystems insgesamt führt. So wurden bei Gabe von MALP-2 als Adjuvans zu dem Modell-Antigen bezogen auf das Gesamt-IgA 36 % bzw. 23 %
30 antigenspezifisches IgA in Lungen- und Vaginal-Lavagen gefunden. Dies zeigt, dass die erfindungsgemäßen Lipopeptide nicht nur lokale mukosale Immunantworten hervorrufen können, sondern dass die Verbreitung von IgA-produzierenden Zellen zu anderen entfernten Schleimhautgebieten in einem Maße erfolgt, das zu guten

- 12 -

mukosalen Immunantworten führt. Diese Wirkung ist an den mukosalen Verabreichungsweg gebunden.

Die Mitverabreichung der erfindungsgemäßen Lipopeptide zum Antigen rief auch
5 stärkere zelluläre Immunantworten hervor als CTB, sowohl regional in Lymphknoten
als auch in der Milz ($p < 0,05$). Die Analyse β -Galactosidase-spezifischer IgG-
Isotypen und die Profile der durch *in vitro* stimulierte Zellen sekretierten Zytokine
zeigten, dass die Mitverabreichung der Lipopeptide ein dominantes Th2-
Antwortmuster auslöste. Die Ergebnisse der Untersuchungen belegen daher, dass
10 die erfindungsgemäßen Lipopeptide wirksame Adjuvantien für die mukosale
Verabreichung von Antigenen in Vakzinen darstellen.

Ein wichtiger Aspekt, der hier hervorgehoben werden soll, ist, dass eine
inkrementelle Erhöhung der Lipopeptid-Dosis (von den hier genannten optimalen
15 Dosen ausgehend) zu einer stetigen Verringerung der Immunantwort führt. Dieser
gegenläufige Effekt ist unerwartet und war aus dem Stand der Technik nicht
herzuleiten.

BEISPIELTEIL

20

Allgemeines

Die in den Beispielen dargestellten Untersuchungen wurden vorrangig mit einem
synthetischen, einem aus *Mycoplasma* stammenden Lipopeptid weitgehend
25 entsprechenden MALP-2 als Mukosal-Adjuvans zusammen mit β -Galaktosidase als
Model-Antigen durchgeführt. Dieses spezielle Beispiel-Lipopeptid wurde auf Grund
seiner vorher bestimmten intrinsischen Eigenschaften (biochemische
Eigenschaften, Makrophagen-stimulierende Aktivität) ausgewählt. Sofern nichts
anderes angegeben, ist das in den Beispielen verwendete synthetische Lipopeptid
30 S-[2,3-bispalmitoyloxypropyl]cysteinyl-GNNDENISFKEK im folgenden stets
einfach als "MALP-2" bezeichnet.

Die Dosen für MALP-2 wurden zunächst in Vorstudien eingegrenzt, in denen MALP-
2 subkutan., intradermal, intranasal oder intraperitoneal an Mäuse verabreicht

- 13 -

wurde. In allen Protokollen führte die gleichzeitige bzw. zusammengehörige Verabreichung von MALP-2 mit β -Galaktosidase zu einem signifikanten Anstieg der Produktion β -Galactosidase-spezifischer Antikörper. Die induzierten Immunantworten, die in Anwesenheit von MALP-2 nach Impfung auf intranasalem oder intraperitonealem Wege erhalten wurden, wurden dann analysiert und mit den
5 in Vergleichsversuchen mit CTB als Adjuvans erhaltenen verglichen.

Die Beispiele ergeben, dass die Verwendung von MALP-2 in einer Dosis von nur 0,5 μ g pro Verabreichung zu einer signifikanten Erhöhung sowohl der humoralen als auch der zellulären β -Galactosidase-spezifischen Antworten führte. Bereits
10 intraperitoneale Verabreichung führte zu einer verbesserten Immunantwort, die intranasale Route erwies sich jedoch als noch weit effektiver. Im Gegensatz dazu war ein dreifacher molarer Überschuss an CTB erforderlich um vergleichbare systemische oder mukosale humorale Antworten zu erhalten. Bezüglich der
15 zellulären Antworten zeigten Milzzellen von mit MALP-2 immunisierten Mäusen eine deutlich höhere Proliferation ($p < 0,05$) als solche aus Tieren, die mit dem dreifachen molaren Überschuss an CTB vakziniert worden waren.

Die mit MALP-2 als Adjuvans auf intranasalem Wege erhaltene Primärantwort wurde bezüglich der Kinetik der β -Galactosidase-spezifischen Antikörper-Antwort
20 durch die Anwesenheit hoher Antikörpertiter charakterisiert, die schon nach der Erstimmunisierung fast das Maximalplateau erreichten. Humorale und zelluläre Antworten fielen nach i.n.-Vakzinierung stärker aus, was auf eine differenzierte lokale Wirkung von MALP-2 hinweist, die entweder auf seine Bioverfügbarkeit oder
25 die räumliche Verteilung der spezifischen Rezeptoren in den Zielzellen zurückgeführt werden könnte. Wie bereits beschrieben wurden auch in durch die Vakzinierungsrouten nicht direkt erreichbaren Schleimhautgeweben deutliche Immunantworten gefunden, nämlich β -Galactosidase-spezifisches IgA in Lungen und Vaginal-Lavagen.

30

Die Untersuchungen im Rahmen der Erfindung haben daher ergeben, dass die erfindungsgemäßen Lipopeptide neue und potente Mukosal-Adjuvantien sind, wobei

- 14 -

das Erfordernis, das Ziel-Antigen mit dem aktiven Lipopeptid zu konjugieren, im Gegensatz zu anderen Lipopeptiden entfällt.

Es wurden über den gesamten Verlauf der Experimente bei den geimpften Tieren
5 keine schwerwiegenden Nebenwirkungen oder Zeichen akuter oder chronischer Toxizität beobachtet. Durch die relativ kurze Peptid-Einheit innerhalb der erfindungsgemäßen Lipopeptide besteht eine relativ geringe Immunogenizität, was die Gefahr, dass Immunantworten gegen die Lipopeptide selbst auftreten, minimiert. Dies stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber Proteinen als Adjuvantien dar. Es
10 konnten nach intranasaler Verabreichung von MALP-2 als Adjuvans keine anti-MALP-2 Antikörper detektiert werden. Dies stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber Proteinen als Adjuvantien dar, da eine Immunantwort gegen das Adjuvans selbst eine spätere Immunantwort gegen einen anderen Impfstoff, der mit demselben Adjuvans verabreicht wurde, beeinträchtigen kann. Die erfindungsgemäßen
15 Lipopeptide können in Impfstoffen gegen verschiedenste Pathogene sowie in Krebsvakzinen oder Vakzinen zur Fertilitätskontrolle eingesetzt werden. Weitere Vorteile der Erfindung liegen in der guten Haltbarkeit der Lipopeptide bei Lagerung, größerer Reinheit der synthetisch herstellbaren Lipopeptide und überschaubarem chemischem und biochemischem Verhalten.

20

Legenden der Abbildungen:

Fig. 1. *In vitro* Untersuchungen mit primären dendritischen Zellen: Primäre dendritische Zellen aus Knochenmark von BALB/c-Mäusen wurden unter
25 Verwendung der Rekombinante GM-CSF (5×10^4 U/ml) durch *in vitro*-Reifung von Vorläufern gewonnen. Die reifen dendritischen Zellen wurden mit 10 ng/ml E. coli Lipopolysaccharid (LPS) beziehungsweise 5 ng/ml MALP2 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit CD11c-spezifischen Antikörpern (Dendritenzellmarkern) in Kombination mit Anti-CD40 oder Anti-CD80 oder Anti-CD86 doppelt markiert. Die
30 Expression von CD40, CD80 beziehungsweise CD86 in den CD11c-markierten Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in Prozent positiver Zellen bezüglich der gesamten CD11c-positiven Population ausgedrückt.

- 15 -

Fig. 2. Analyse dendritischer Zellen nach Behandlung mit MAPL-2 mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACScan):

Primäre dendritische Zellen aus Knochenmark von BALB/c-Mäusen wurden unter Verwendung der Rekombinante GM-CSF (5×10^4 U/ml) durch *in vitro*-Reifung von Vorläufern gewonnen. Die reifen dendritischen Zellen wurden mit 10 ng/ml E. coli Lipopolysaccharid (LPS) beziehungsweise 5 ng/ml MALP2 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit CD11c-spezifischen Antikörpern (Dendritenzellenmarkern) in Kombination mit Anti-CD40 oder Anti-CD80 oder Anti-CD86 doppelt markiert und die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Gates wurden auf der Grundlage einer Markierung mit nichtverwandten Kontrollantikörper-Isotopen gesetzt

Fig. 3. Humoralantworten, angeregt nach einer Impfung mit MAPL-2 als Adjuvans:

Mäuse wurden über subkutane (s.c.), intraperitoneale (i.p.), intradermale (i.d.) und intranasale (i.n.) Routen mit entweder reiner β -Galactosidase (40 μ g) oder β -Galactosidase gemischt mit MALP-2 (0.5 μ g) an den Tagen 0, 7 und 14 immunisiert. Am Tag 28 nach der primären Immunisierung wurden Serumproben entnommen und der Titer der β -Galactosidase-spezifischen Antikörper wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als der reziproke \log_2 des geometrisch mittleren Endpunkttiters dargestellt. Zur Kontrolle bezogen wir eine Gruppe ein, in welcher die Tiere über die Route mit β -Galactosidase unter Verwendung von Aluminiumhydroxid als Adjuvans immunisiert wurden.

Fig. 4. Humoralantworten, angeregt nach der Impfung unter Verwendung von

MALP-2 als Adjuvans in einer Dosis von 1 μ g pro Tier und Immunisierung:

Mäuse wurden über die intraperitoneale (i.p.) und intranasale (i.n.) Route mit entweder reiner β -Galactosidase (40 μ g/Dosis) oder β -Galactosidase gemischt mit MALP-2 (1 μ g/Dosis) an den Tagen 0, 7 und 14 immunisiert. Am Tag 28 nach der primären Immunisierung wurden Serumproben entnommen und der Titer der β -Galactosidase-spezifischen Antikörper wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Absorptionswerte (OD 405 nm) dargestellt.

- 16 -

Fig. 5. Zellreaktionen, angeregt nach einer Impfung unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von MALP-2 als Adjuvans.

5 β -Galactosidase-spezifische T-Zell-Proliferationsantworten von Mäusemilzzellen immunisiert über die Routen i.p. oder i.n. mit entweder reiner β -Galactosidase (40 μ g/Dosis) oder β -Galactosidase gemischt mit MALP-2 (1 oder 0.5 μ g/Dosis) an den Tagen 0, 7 und 14. Am 28. Tag nach der primären Immunisierung wurden die Tiere getötet und die Milzzellen wurden in vitro vier Tage im Beisein von 20 μ g/ml löslicher β -Galactosidase re-stimuliert. Die Ergebnisse sind als Stimulationsindizes (cpm Proben/cpm in nichtstimulierten Kontrollzellen) dargestellt.

10

Fig. 6. Kinetik von β -gal-spezifischen IgG-Antworten in Seren geimpfter Mäuse.:

Gruppen von Tieren (n=5) wurden entweder i.n. (A) oder i.p. (B) mit 50 μ g β -gal (), β -gal plus 10 μ g CTB (), β -gal plus 0.5 μ g MALP-2 () oder reiner Pufferlösung () geimpft. Die Tage der Impfungen (Tag 0, 14 und 21) sind mit den Pfeilen markiert.

15 Die Ergebnisse sind als der reziproke \log_2 des geometrischen Endpunkttiters dargestellt, die SEM (mittlere Standardabweichung) ist mittels senkrechter Linien angegeben.

Fig. 7. β -Galactosidase-spezifischer IgA in Lungen- und Vaginalausspülungen von i.n.-geimpften Mäusen:

20

Die Ergebnisse sind als Prozent β -Galactosidase-spezifischer IgA bezüglich des insgesamt vorhandenen IgA dargestellt. Die SEM ist durch senkrechte Linien angegeben.

Fig. 8. Bestimmung der Serum-IgE-Niveaus nach Immunisierung unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans:

25

Mäuse wurden intraperitoneal (i.p.) und intranasal (i.n.) entweder mit reiner β -Galactosidase (40 μ g), ausschließlich MALP-2 oder β -Galactosidase gemischt mit MALP-2 (0.5 μ g) an den Tagen 0, 7 und 14 geimpft. Am 28. Tag nach der Erstimmunisierung wurden Serumproben genommen und die Niveaus von IgE wurden mittels eines Capture-ELISAs bestimmt. Die Ergebnisse sind als IgE-Konzentrationen (ng/ml) dargestellt.

30

- 17 -

Fig. 9. β -Galactosidase-spezifische T-Zell-Proliferationsantworten der Milz (A und B) und regionaler Lymphknotenzellen (C) von i.p. oder i.n. geimpften Mäusen:

Die Zellen wurden in vitro vier Tage lang mit unterschiedlichen Konzentrationen löslicher β -Galactosidase re-stimuliert. Die Ergebnisse sind als mittlerer cpm-Wert
5 subtrahiert von den Hintergrundwerten nichtstimulierter Zellen aus Dreifachgruppen dargestellt. Die SEM ist durch senkrechte Linien dargestellt.

Fig. 10. Im geimpften Mäusen stimulierte Th-Profile:

Serum- β -Galactosidase-spezifische IgG-Isotypen und -Zytokine, ausgeschieden
10 von in vitro stimulierten Milzzellen, wurden bei den geimpften Mäusen mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Konzentrationsverhältnisse von IgG1/IgG2a und IL-10/IL-2 (die am häufigsten gefundenen Zytokine) dargestellt.

Fig. 11. Zytokine ausgeschieden von in vitro stimulierten Zellen geimpfter Mäuse:

15 Die Zytokinproduktion wurde mittels ELISA im Flüssigkeitsüberstand von Zellen, welche 48 (IL-2) beziehungsweise 96 Stunden (IFN γ , IL-4 und IL-10) lang im Beisein von β -gal (20 μ g/ml) kultiviert wurden, gemessen. Die Ergebnisse sind als das Verhältnis zwischen den in den geimpften Gruppen vorgefundenen Zytokinmengen im Vergleich zu den nicht-geimpften Kontrollmäusen dargestellt.

20

Fig. 12: Humoralantworten stimuliert nach Vakzinierung mit MALP-2 als Adjuvans in einer Dosis von 2 μ g pro Tier pro Immunisierung. Die Mäuse wurden entweder mit β -Galactosidase alleine (100 μ g/Dosis) oder mit β -Galactosidase gemischt mit MALP-2 (2 μ g/Dosis) an den Tagen 0, 7, 14 und 31 oral immunisiert. Am Tag 45
25 nach der Erstimmunisierung wurden Serumproben genommen und die Titer der β -Galactosidase-spezifischen Antikörper wurden mit ELISA bestimmt.

- 18 -

Beispiel 1: *In vitro*-Stimulierung von primären aus dem Knochenmark gewonnenen dendritischen Nagetierzellen mittels MALP-2.

Versuchsprotokoll: Kulturen primärer aus dem Knochenmark gewonnener dendritischer Zellen wurden von BALB/c-Mäusen nach *in vitro*-Reifung von Vorläufern im Beisein der Rekombinante GM-CSF (5×10^4 U/ml) nach den üblichen Verfahren erhalten. Die reifen dendritischen Zellen wurden mit *E. coli* Lipopolysaccharid (LPS) oder 5 ng/ml MALP2 stimuliert. Nach 12 beziehungsweise 24 Stunden Stimulierung wurden die Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert, um die Expression von Oberflächenmarkern, die für die Fähigkeit zur Antikörperpräsentation von Bedeutung sind, festzustellen.

Um Verbindungen zu bestimmen, welche bei *in-vivo*-Anwendungen auf dem Gebiet der Vakzinierungen ein Potential als Adjuvans besitzen, wurde eine erste *in-vitro*-Untersuchung mit primären Kulturen aus Knochenmark stammender dendritischer Zellen durchgeführt. Es wurden dendritische Zellen ausgewählt, da sie die effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen sind und bei der primären Immunantwort eine Schlüsselrolle spielen. Tatsächlich sind sie der einzige Zelltyp, der *in vivo* in der Lage ist, ruhende T-Zellen zur Initiierung einer primären Immunantwort zu aktivieren. Demzufolge wurden dendritische Zellen mit den untersuchten Einheiten oder LPS, was zur Kontrolle diente, behandelt. Es wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben entnommen, mit fluoreszenz-markierten Antikörpern, die spezifisch sind für zelluläre Marker, welche für die antigenpräsentierenden Fähigkeiten der dendritischen Zellen entscheidend sind, markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die vorgefundenen Ergebnisse (Fig. 1 und 2) zeigen, dass im Unterschied zur positiven Kontrollgruppe die Expression von CD40 und dem ko-stimulierenden Molekül CD86 in den mit MALP-2 behandelten dendritischen Zellen nicht erhöht war. Die Wirkung auf die Expression des co-stimulierenden Moleküls CD80 war gering, falls überhaupt vorhanden. Co-stimulierende Moleküle senden Signale, welche zusätzlich zur Präsentation der beteiligten Epitope innerhalb des Kontextes der MHC-Moleküle für die wirksame Aktivierung der T-Zellen wesentlich sind. Es wurde früher schon berichtet, dass die Wirkung bewährter Schleimhautadjuvantien (Mukosal-Adjuvantien) wie z.B. Choleratoxin mit einer selektiven Verstärkung der Expression co-stimulierender Moleküle verbunden ist. Demzufolge deuten die *in vitro* gefundenen Ergebnisse

- 19 -

stark darauf hin, dass MALP-2 kein oder geringes Potential als Schleimhautadjuvans aufweist.

Beispiel 2: Humoralantworten, angeregt nach einer Impfung über unterschiedliche Wege unter Verwendung von MALP-2 in unterschiedlichen Konzentrationen als Adjuvans.

Versuchsprotokoll: Sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c- (H-2d) Mäuse wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) gekauft und gemäß den örtlichen und EU-Richtlinien behandelt. Gruppen von jeweils 5 Mäusen wurden am Tag 1, 7 und 14 entweder mit 40 µg reiner β -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland), oder unter Zumischung von 1 beziehungsweise 0,5 µg von synthetischem MALP-2 geimpft. Für die intranasale Verabreichung (i.n.) wurden 10 µl in jedes Nasenloch appliziert, während bei der Injektion i.p., s.c. und i.d. β -Galactosidase mit beziehungsweise ohne MALP-2 in 400, 100 beziehungsweise 100 µl PBS re-suspendiert wurde. 28 Tage nach der Erstimpfung wurden Serumproben entnommen und bei -20°C bis zur Bestimmung der β -gal-spezifischen Antikörper aufbewahrt. Nunc-Immuno MaxiSorp-Testplatten mit 96 Mulden (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit 100 µl β -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) mit 5 µg/ml in 0.05 M Carbonatpuffer (pH 8.2) pro Mulde beschichtet. Serumverdünnungen mit 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 in PBS wurden hinzugefügt (100 µg/Mulde), und die Platten wurden bei 37°C 24 Stunden lang inkubiert. Nach dem Spülen wurde biotinyliertes γ -kettenspezifisches Ziegen-Antimaus-IgG (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) hinzugefügt und die Platten wurden eine weitere Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden 100 µl peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Pharmingen) zu den Zellen hinzugegeben und die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden die Reaktionen mittels ABTS in 0,1 M Zitratphosphatpuffer (pH 4,35), welcher 0,01 % H_2O_2 enthielt, entwickelt. Die Ergebnisse wurden entweder nach der Absorption bei 405 nm oder den Endpunkttitern (reziproker \log_2 der letzten Verdünnung, welche nach 30 Minuten Inkubation bei 405 nm eine optische Dichte von 0,1 Einheiten über den Werten der negativen Kontrollgruppe ergab) dargestellt.

- 20 -

Trotz der enttäuschenden Ergebnisse, welche bei der *in vitro* Untersuchung von primären dendritischen Zellen unter Verwendung von MALP-2 festgestellt wurden, beschlossen wir, bei der sekundären *in vivo* Untersuchung Gruppen von Tieren einzubeziehen, die unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans geimpft worden waren. Demzufolge wurden die Mäuse entweder mit dem reinen Modellantigen β -Galactosidase oder mit dem Antigen plus MALP-2 i.p., s.c., i.d. und i.n. geimpft. Im Gegensatz zu den Erwartungen stellte man eine starke Adjuvanswirkung fest, wenn das Antigen mit 0,5 μ g MALP-2 gemischt war, und zwar unabhängig von der Art und Weise der Applikation (Fig. 3). Die stärksten Reaktionen wurden bei den Impfungen i.p. und i.n. festgestellt. Die erhaltenen Antworten waren jedoch immer wenigstens genauso stark (i.d.) oder stärker als bei der Verwendung von Aluminiumhydroxid als Standardadjuvans bei s.c. Injektion (Fig. 3).

Da bei vorangegangenen Untersuchungen unter Verwendung konventioneller Lipopeptide wesentlich höhere Konzentrationen des als Adjuvans verwendeten Bestandteils gegeben wurden, wurde die Wirkung höherer Dosen von MALP-2 zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Tiere mit 1 μ g MALP-2 als Adjuvans über die zwei wirksamsten Immunisationswege (i.p. und i.n.) mit β -Galactosidase geimpft. Im Gegensatz zu den Erwartungen führte die Erhöhung der Dosis von MALP-2 zu einer Aufhebung der Adjuvanswirkung (Fig. 4). Dies zeigte, dass wir bei einer Anwendung der Standardkonzentrationen, welche in der Literatur für andere Lipopeptide angegeben sind, bei den *in vivo* Untersuchungen von MALP-2 nicht in der Lage gewesen wären, eine Adjuvanswirkung auf der Ebene der Humoralantworten festzustellen.

25

Beispiel 3: Humoral Immunantworten, angeregt nach Impfung über verschiedene Wege unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans in unterschiedlichen Konzentrationen.

Versuchsprotokoll: Sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c- (H-2d) Mäuse wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) gekauft und gemäß den örtlichen und EU-Richtlinien behandelt. Gruppen von jeweils 5 Mäusen wurden am Tag 1, 7 und 14 entweder mit 40 μ g reiner β -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland), oder unter Zumischung von 1 beziehungsweise 0,5 μ g

- 21 -

synthetischem MALP-2 geimpft. Für die intranasale Verabreichung (i.n.) wurden 10 µl in jedes Nasenloch appliziert, während bei der Injektion i.p. β-Galactosidase mit beziehungsweise ohne MALP-2 in 400 µl PBS re-suspendiert wurde. Die Milzen wurden entfernt und für die Bestimmung der zellulären Immunreaktionen
5 zusammengekommen (gepoolt). Die Zellen wurden in RPMI 1640 ergänzt mit 10 % Kalbsfötenserum, 100 U/ml Penizillin, 50 µg/ml Streptomycin, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 1 mM L-Glutamin (GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Die Milzzellensuspensionen wurden auf 5×10^6 Zellen/ml im vollständigen Medium
10 eingestellt. Sie wurden zu 100 µl/Mulde in einer flachbödigen Mikrotiterplatte (Nunc) mit 96 Mulden eingebracht und diese Platten wurden 4 Tage lang unter Beifügung von 20 µg/ml löslicher β-Galactosidase inkubiert. Während der letzten 18 Stunden der Kultivierung wurden jeder Mulde 1 µCi [³H]Thymidin (Amersham International, Freiburg, Deutschland) zugefügt. Die Zellen wurden dann mit einem Zellenernter
15 (Inotech, Wohlen, Schweiz) auf Filterpapier geerntet (Filtermat A; Wallac, Freiburg, Deutschland) und die Menge des in die DNS der vermehrten Zellen eingebetteten [³H]Thymidins wurde mit Hilfe eines γ-Scintillationszählers (Wallac 1450, Micro-Trilux) bestimmt. Die Ergebnisse sind als das arithmetische Mittel der [³H]Thymidinaufnahme in cpm dargestellt. Die Ergebnisse sind als
20 Stimulationsindices (SI, cpm Proben/cpm in nicht-stimulierten Kontrollzellen) dargestellt.

Unter Berücksichtigung der überraschenden Verringerung der Adjuvanswirkung auf humoraler Ebene, die bei der Verwendung von MALP-2 in höheren Dosierungen
25 beobachtet wurde, wurde beschlossen, festzustellen, ob eine ähnliche Wirkung auf der Ebene der zellulären Immunantworten beobachtet werden kann. Demzufolge wurden Mäuse mit entweder reiner β-Galactosidase oder β-Galactosidase gemischt mit 1 µg MALP-2 immunisiert. Achtundzwanzig Tage nach der Immunisierung wurden die Milzen gereinigt, in vitro mit 20 µg/ml β-Galactosidase re-stimuliert und
30 ihre Vermehrungsfähigkeit wurde mit Hilfe der Messung der Einbettung von [³H]Thymidin in ihre DNS mittels eines γ-Scintillationszählers bestimmt. Die erzielten Ergebnisse (Fig. 5) bestätigten, dass die Verwendung von MALP-2 in höheren Dosierungen nicht nur dazu führt, dass keine Humoralantworten mehr festgesellt

- 22 -

werden können, sondern auch die über die Zellen vermittelte Immunisierung wird verringert.

Beispiel 4: Gemeinsame intranasale und intraperitoneale Verabreichung von MALP-2 mit einem löslichen Antigen stimuliert wirksame systemische Humoralantworten.

Versuchsprotokoll: Sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c- (H-2d) Mäuse wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) gekauft und gemäß den örtlichen und EU-Richtlinien behandelt. Gruppen von jeweils 5 Mäusen wurden am Tag 1, 14 und 21 entweder mit 40 µg reiner β -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) unter Zumischung von 0.5 µg synthetischer MALP-2 beziehungsweise 10 µg Cholera toxin B Untereinheit (CTB; ICN Biomedicals Inc., Ohio) als Standardadjuvans geimpft. Für die intranasale Verabreichung (i.n.) wurden 10 µl in jedes Nasenloch appliziert, während bei der Injektion i.p. β -Galactosidase mit beziehungsweise ohne MALP-2 in 400, 100 beziehungsweise 100 µl PBS re-suspendiert wurde. Serumproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen (Tag 0, 13, 20 und 30) und bei -20°C bis zur Bestimmung der β -Galactosidase-spezifischen Antikörper aufbewahrt. Nunc-Immuno MaxiSorp-Testplatten mit 96 Mulden (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden mit 100 µl β -gal (Boehringer, Mannheim, Deutschland) mit 5 µg/ml in 0.05 M Karbonatpuffer (pH 8.2) pro Mulde beschichtet. Serielle zweifache Verdünnungen der Seren oder Auswaschungen in PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 wurden hinzugefügt (100 µl/Mulde) und die Platten wurden bei 37°C 24 Stunden lang inkubiert. Nach dem Spülen wurde biotinyliertes γ -kettenspezifisches Ziegen-Antimaus-IgG (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) hinzugefügt und die Platten wurden eine weitere Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden 100 µl peroxidase-konjugiertes Streptavidin (Pharmingen) zu den Zellen hinzugegeben und die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden die Reaktionen mittels ABTS in 0,1 M Zitratphosphatpuffer (pH 4,35), welcher 0,01 % H_2O_2 enthielt, entwickelt. Die Ergebnisse wurden als der reziproke \log_2 der letzten Verdünnung, welche nach 30-minütiger Inkubation eine optimale Dichte bei 405 nm von 0,1 Einheiten im Vergleich zu den Werten der negativen Kontrollgruppe ergab, dargestellt.

- 23 -

Aufgrund der ermutigenden Ergebnisse der Vorstudien beschlossen wir, die bei der Verwendung von MALP-2 als Adjuvans über die beiden wirksamsten Immunisierungswege, nämlich i.p. und i.n., festgestellten Immunreaktionen detailliert zu analysieren und sie mit denen eines bewährten Schleimhautadjuvans zu vergleichen. Demzufolge wurde die Fähigkeit von MALP-2, wirksame Humoralimmunreaktion hervorzurufen bewertet, indem die Serumtiters von β -Galactosidase-spezifischen Antikörpern bei geimpften Mäusen bestimmt wurden. Wie in Fig. 6A dargestellt, ergab die Administration von reiner β -Galactosidase (50 μ g/Dosis) die Induktion sehr niedriger Antikörpertiter, sogar nach einem zweiten Boosting (Endpunkttiter ca. 1000). Im Vergleich dazu induzierte die Administration von β -Galactosidase unter Verwendung von MALP-2 i.n. schon bei einer einfachen Dosis zu Induktion sehr hoher Titer (> 60.000) von spezifischem IgG bei allen Mäusen, und am Ende des Immunisierungsprotokolls lagen die Titer über 500.000 (Fig. 6). Die Kinetik und die Gesamtwirksamkeit der Antikörperreaktionen, die mit 0,5 μ g MALP-2 erreicht wurden, waren denen, die mit der Verabreichung von β -Galactosidase mit 10 μ g CTB, einem bewährten Schleimhautadjuvans, welches als positive Kontrollsubstanz verwendet wurde, erreicht wurden, sehr ähnlich.

Eine deutliche Adjuvanswirkung wurde auch beobachtet, wenn MALP-2 i.p. appliziert wurde. Insbesondere die Co-Injektion von MALP-2 führte zu einer 100-fachen Steigerung der β -Galactosidase-spezifischen IgG-Titer im Vergleich zu den Titern bei Tieren, welche mit reiner β -Galactosidase immunisiert worden waren (Fig. 6B). Dieser Unterschied war schon nach der ersten Immunisierung festzustellen und wurde nach Booster-Injektionen aufrechterhalten. Am 31. Tag wurden bei Tieren, die entweder i.n. oder i.p. immunisiert worden waren, ähnliche Antikörpertiter festgestellt. Allerdings waren die Primärreaktionen nach der MALP-2-Co-Injektion nach der i.n. Impfung stärker ausgeprägt.

Beispiel 5: Intranasale Co-Administration von MALP-2 mit einem löslichen Antigen stimuliert wirksame Schleimhautantikörperantworten.

Versuchsprotokoll: Am 31. Tag wurden die Mäuse getötet und es wurden die endgültigen Proben entnommen. Es wurden Vaginal- und Lungenausspülungen gewonnen, indem die Organe mit 1 ml PBS, ergänzt durch 50 mM EDTA, 0,1 % BSA und 10 mM PMSF gespült wurden. Die Ausspülungen wurden anschließend

- 24 -

- zentrifugiert, um Gewebstrümmer zu entfernen (10 min bei 3000 x g) und die verbleibende Flüssigkeit wurde bei -20°C aufbewahrt. Um die Konzentration des Gesamt-IgA in der Spülflüssigkeit aus Lunge und Vagina zu bestimmen, wurden serielle Verdünnungen der entsprechenden Proben in Mikrotiterplatten inkubiert, wobei diese Platten zuvor mit Ziegen-Antimäus-IgA (Sigma Chemie) als Einfangantikörper (100 µl/Mulde) überzogen wurden. Es wurden serielle Verdünnungen gereinigter Maus-IgA (Sigma Chemie) zur Erzeugung einer Standardkurve verwendet.
- 10 Um die Fähigkeit von MALP-2 zur Stimulierung von Mukosal-Antworten gegen Antigene, die i.n. co-administriert wurden, zu untersuchen, wurde die Produktion von β -Galactosidase-spezifischem IgA in Lungen- und Vaginalspülflüssigkeit immunisierter Tiere. Während nach der i.n. Impfung mit reiner β -Galactosidase keine Produktion β -Galactosidase-spezifischer IgA in der Lungenspülflüssigkeit in
- 15 nachweisbarer Menge erfolgte, wurde bei den mit β -Galactosidase und MALP-2 immunisierten Tieren ein signifikanter Anstieg der Niveaus antigenspezifischer IgA festgestellt (Fig. 7). Die Co-Administration von MALP-2 führte zur Stimulierung einer wirksamen IgA-Produktion auch in entfernt liegenden Schleimhäuten, wie dies durch die Anwesenheit signifikanter Konzentrationen von β -Galactosidase-spezifischem
- 20 IgA in der Vaginalspülflüssigkeit nachgewiesen wird (Fig. 7). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Niveaus der β -Galactosidase-spezifischen Antikörper in den Schleimhäuten zwischen Tieren, die mit 0.5 µg MALP-2 oder 10 µg CTB immunisiert worden waren, festgestellt.
- 25 **Beispiel 6: Die Immunisierung unter Verwendung von MALP-2 als Adjuvans führt nicht zu mehr Serum-IgE.**
- Versuchsprotokoll:* Zur Bestimmung der Konzentration des Gesamt-IgE im Serum von immunisierten und Kontrolltieren, wurden serielle Verdünnungen der entsprechenden Proben in Mikrotiterplatten, welche zuvor mit Antimäus-IgE (100
- 30 µl/Mulde) als Einfangantikörper überzogen wurden, inkubiert. Nach Blockierung mit PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween-20 zwei Stunden lang bei Zimmertemperatur wurde eine 1:100 -Verdünnung des Serums in PBS-Tween hinzugefügt (100 µl/Mulde) und die Platten wurden eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach dem

- 25 -

Spülen wurde biotinyliertes Antimäus-IgE hinzugefügt und die Platten wurden eine weitere Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach viermaligem Spülen wurden 100 µl peroxidase-konjugierten Streptavidins (Pharmingen) in die Mulden gegeben und die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden
5 die Reaktionen mittels ABTS in 0,1 M Zitratphosphatpuffer (pH 4,35) und einem Gehalt von 0,01 % H₂O₂ entwickelt. Es wurden serielle Verdünnungen von gereinigtem Maus-IgE verwendet, um eine Standardkurve zu erzeugen.

Es ist eine anerkannte Tatsache, dass die Verwendung bestimmter
10 Schleimhautadjuvantien aufgrund einer Erhöhung der Produktion von IgE zu allergischen Reaktionen führen kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, haben wir damit begonnen, die Wirkung der Verabreichung von MALP-2 auf den Serumgehalt von IgE zu prüfen. Wie aus Fig. 8 hervorgeht, führt die Administration von MALP-2 über den parenteralen (i.p.) Weg bzw. die Schleimhäute nicht zu einer
15 Erhöhung des Serumgehaltes an IgE. Im Gegenteil, die Anwesenheit von MALP-2 scheint sogar eine positive Wirkung auf die Steigerung des-IgE-Gehaltes zu haben wie sie am 28. Tag nach der Impfung mit reiner β-Galactosidase i.p. beobachtet wurde.

20 **Beispiel 7: MALP-2 stimuliert effektive durch T-Zellen vermittelte Proliferationsreaktionen, wenn es gemeinsam mit einem löslichen Antigen verabreicht wird**

Versuchsprotokoll: Unter dem Unterkiefer gelegene Lymphknoten und die Milzen wurden entfernt und für die Analyse der Zellimmunreaktionen
25 zusammengenommen. Die Zellen wurden in RPMI 1640, ergänzt durch 10 % fötales Kalbsserum, 10 U/ml Penizillin, 50 µg/ml Streptomycin, 5 × 10⁻⁵ M 2-Mercaptoethanol und 1 mM L-Glutamin (GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland) vermehrt und bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ aufbewahrt. Die Suspensionen aus Lymphknoten- und Milzzellen wurden auf 5 × 10⁶ Zellen/ml im
30 vollständigen Medium eingestellt, in eine flachbödige Mikrotiterplatte mit 96 Mulden (Nunc) mit 100 µl/Mulde ausgebracht, und die Platten wurden vier Tage lang in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen löslicher β-Galactosidase inkubiert. Jede Konzentration wurde in Dreiergruppen geprüft. Während der letzten 18

- 26 -

Stunden der Inkubierung wurde jeder Mulde 1 μCi [^3H]Thymidin (Amersham International, Freiburg, Deutschland) zugefügt. Anschließend wurden die Zellen auf Filterpapier (Filtermat A; Wallac, Freiburg, Deutschland) unter Verwendung eines Zellernters (Inotech, Wohlen, Schweiz) geerntet und die Menge des eingebetteten
5 [^3H]Thymidins in die DNS der vermehrten Zellen wurde mit Hilfe eines γ -Scintillationszählers (Wallac 1450; Micro-Trilux) bestimmt. Die Ergebnisse wurden als das arithmetische Mittel der Aufnahme von [^3H]Thymidin in cpm dargestellt.

Die Immunreaktionen von T-Zellen wurden am 31. Tag untersucht, indem die
10 Vermehrung der Zellen, welche aus regionalen Lymphknoten und Milzen nach der in vitro Re-Stimulierung mit β -Galactosidase gewonnen wurden, bestimmt wurde. Die Milzzellen von Tieren, welche mit reiner β -Galactosidase i.p. geimpft worden waren, wurden als positive Kontrollgruppe verwendet und zeigten eine signifikante Vermehrungsreaktion im Vergleich zur nichtimmunisierten Gruppe (Fig. 9A). Eine
15 weitere Steigerung der Proliferation wurde bei Milzzellen festgestellt, welche von Tieren stammten, die eine Co-Injektion von MALP-2 und Antigen erhalten hatten ($p < 0,05$). Während die i.n. Administration von reiner β -Galactosidase keine nachweisbare Zellvermehrung hervorrief, führte die Mitverabreichung von MALP-2 zu einer effektiven Proliferationsantwort sowohl bei regionalen (Lymphknotenzellen)
20 als auch bei systemischen (Milzzellen) (Fig. 9B und C). Bemerkenswert ist, dass die stärkste T-Zell-Proliferation bei den Milzzellen von Mäusen beobachtet wurde, bei denen MALP-2 und β -Galactosidase i.n. appliziert worden waren (Fig. 9B). In allen Fällen wurde eine deutlich dosisabhängige Wirkung durch die Erhöhung der β -Galactosidase-Konzentration während der Re-Stimulierung festgestellt (5, 10, 20
25 $\mu\text{g/ml}$). Letztlich führte die Verwendung von MALP-2 (0.5 μg) als Adjuvans zu einer statistisch signifikanten ($p < 0,05$) Steigerung der T-Zellenvermehrung im Vergleich zur i.n. Immunisierung mit (10 μg) plus β -Galactosidase (Fig. 8B).

- 27 -

Beispiel 8: Analyse von T-Helfermustern hervorgerufen durch die Verwendung von MALP-2 als Adjuvans .

Versuchsprotokoll: Nunc-Immuno MaxiSorp Testplatten mit 96 Mulden (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden beschichtet mit 100 µl β -Galactosidase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) bei 5 µg/ml in 0.05 M Karbonatpuffer (pH 8.2) pro Mulde. Es wurden serielle Zweifachverdünnungen von Serum oder Spülflüssigkeit in PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 hinzugefügt (100 µl/Mulde), und die Platten wurden 2 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Nach dem Spülen wurde biotin-konjugiertes Ratten-Antimaus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, beziehungsweise -IgG3 (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) zugefügt, um die Ig-Unterklassen zu bestimmen. Die Platten wurden eine weitere Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden den Zellen 100 µl peroxidase-konjugierten Streptavidins (Pharmingen) zugefügt, und die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Nach vierfachem Spülen wurden die Reaktionen mit ABTS in 0.1 M Zitratphosphatpuffer (pH 4.35), welcher 0,01 % H₂O₂ enthielt, entwickelt. Um die Konzentration der IgG-Unterklassen im Serum zu bestimmen, wurden Standardkurven erzeugt, indem die Mulden mit einem isotyp-spezifischen Ziegen-Antimaus-IgG beschichtet und dann mit gereinigten Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b beziehungsweise -IgG3-Antikörpern (Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert wurden.

Flüssigkeitsüberstände von Kulturen sich vermehrender Zellen wurden an den Tagen 2 und 4 entnommen und bei -70 °C aufbewahrt. Die Bestimmung von IFN- γ IL-2, IL-4, und IL-10 wurde mittels ELISA ausgeführt, wobei kommerzielle Antikörper von Pharmingen gemäß den Herstelleranweisungen verwendet wurden. Kurz gesagt, wurden Mikrotiterplatten mit 96 Mulden über Nacht mit gereinigtem Ratten-Antimaus-IFN- γ , anti-IL-2, anti-IL-4 beziehungsweise anti-IL-10 mAbs (Pharmingen) bei 4 °C beschichtet. Nach drei Spülungen wurden die Platten blockiert und die Flüssigkeitsüberstände wurden in die Mulden gegeben. Für jedes Zytokin wurde eine Standardkurve erzeugt, indem die entsprechenden rekombinanten Nagetierzytokine (Pharmingen) verwendet wurden. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur weitere 4 Stunden lang inkubiert. Nach dem Spülen wurde biotinyliertes Ratten-Antimaus-IFN- γ IL-2, IL-4 beziehungsweise -IL-10 mAbs

- 28 -

(Pharmingen) in die Mulden gegeben und die Platten wurden eine Stunde lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach sechsfachem Spülen wurde Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugefügt und die Platten wurden 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten wie oben beschrieben mit

5 ABTS entwickelt.

Zuerst wurde die Unterklassenverteilung des β -Galactosidase-spezifischen IgG, welches im Serum der immunisierten Mäuse vorhanden war. Wie in Tabelle 1 dargestellt, war der Haupttyp der β -Galactosidase-spezifischen Igl-Isotypen IgG1, unabhängig vom Immunisierungsprotokoll. Dieses dominante Th2-Reaktionsmuster war schon nach der ersten Impfdosis erkennbar und blieb während der folgenden

10 Booster erhalten. IgG1 war der einzige Isotyp, welcher bei der Verabreichung reiner β -Galactosidase festgestellt wurde, während die Co-Administration mit CTB oder MALP-2 zur Feststellung weiterer β -Galactosidase-spezifischer Isotypen, nämlich

15 IgG2a (Typ Th1), IgG2b (Typ Th2) und IgG3 (Typ Th1) führte. Trotzdem blieb das Verhältnis von IgG1/2a (Fig. 10), IgG1/2b beziehungsweise IgG1/3 größer als 100.

Tabelle 1. β -Galactosidase-spezifische IgG-Isotypen im Serum immunisierter Mäuse^a

Immunisierungsgruppe	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
β -gal (i.n.)	22,6 +/- 21,3	0,7 +/- 0,5	0,3 +/- 0,1	0,6 +/- 0,0
β -gal + MALP-2 (i.n.)	6439,0 +/- 1775,	20,8 +/- 5,4	43,3 +/- 18,9	2,4 +/- 0,5
β -gal + CTB (i.n.)	4108,3 +/- 1437,	31,9 +/- 9,5	49,2 +/- 17,3	2,4 +/- 0,6
β -gal (i.p.)	191,5 +/- 132,1	0,1 +/- 0,0	0,5 +/- 0,1	0,6 +/- 0,0
β -gal + MALP-2 (i.p.)	2829,7 +/- 1119,	10,0 +/- 2,8	15,8 +/- 6,2	2,3 +/- 0,6
Kontrollgruppe	0,4 +/- 0,0	0,23 +/- 0,0	0,1 +/- 0,0	0,4 +/- 0,0

20 ^a Die Ergebnisse sind als das Mittel (μ g/ml) \pm SEM dargestellt (5 Mäuse pro Gruppe)

Um die Art der Th-Reaktion, welche durch die Immunisierung hervorgerufen wurde, weiter zu charakterisieren, wurde der Gehalt an IFN- γ , IL-2, IL-4 und IL-10 in den Flüssigkeitsüberständen von *in vitro* stimulierten Milzzellen gemessen (Fig. 11A). Es

25 wurde festgestellt, dass von diesen vier Zytokinen IL-10 am stärksten vertreten war,

- 29 -

was darauf hinweist, dass ein Th2-Antwortmuster erzeugt worden war. Der Gehalt an IL-10 war bei Mäusen, welche mit MALP-2 i.n. immunisiert worden waren, signifikant höher, als bei der Kontrollgruppe (2,2 ng/ml im Vergleich zu 0,009 ng/ml, $p < 0,005$) und auch im Vergleich zu Tieren, bei denen CTB als Schleimhautadjuvans verwendet worden war (0,6 ng/ml, $p < 0,05$). Das beobachtete Antwortmuster mit einem dominanten Zytokin vom Typ Th2 stimmte mit der Feststellung von β -Galactosidase-spezifischem IgG1 bei denselben Tieren überein (Fig. 10). Tatsächlich stimmt die starke Stimulierung der IL-10-Sekretion mit der Rolle überein, welche dieses Zytokin bei der Hemmung der Zytokinsynthese durch Th1-Zellen, der Verbesserung der B-Zellenvermehrung und der Stimulierung der IgA-Produktion spielt.

Trotz der Tatsache, dass in den Zellkulturmedien von Zellen, die aus regionalen Lymphknoten gewonnen wurden, geringere absolute Werte der Zytokinkonzentration festgestellt wurden, glich das allgemeine Muster dem für die Milzzellkulturen festgestellten (Fig. 10). Interessant ist, dass zwar die Ausscheidung von IL-10 und IL-4 auch in den Zellen von Mäusen stimuliert wurde, die mit reiner β -Galactosidase i.p. immunisiert worden waren, die Th1-Zytokine IL-2 und IFN- γ aber unter der Nachweisgrenze blieben. Im Gegensatz dazu wurden IL-2 und IFN- γ auch bei den Mäusen festgestellt, welche das Antigen gemischt mit CTB oder MALP-2 erhalten hatten (Fig. 10). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den festgestellten IgG-Isotypmustern (Tabelle 1) und bestätigen, dass zwar Th2-Reaktionstypen vorherrschen, aber MALP-2 auch die Stimulierung von Th1-Zellen unterstützt.

Beispiel 9: Orale Immunisierung mit dem Modellantigen β -Galactosidase unter Verwendung von MALP-2 als Schleimhautadjuvans.

Es wurden sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c (H-2d)- Mäuse von Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) eingekauft und entsprechend lokaler Richtlinien und Richtlinien der europäischen Gemeinschaft behandelt. Gruppen von je 5 Mäusen wurden an Tagen 1, 14, 21 und 31 mit 100 μ g β -gal (Boehringer, Mannheim, Deutschland) entweder alleine oder mit 2 μ g synthetischem MALP-2 als Adjuvans auf oralem Wege (Dosis 25 μ l) immunisiert. An Tag 45 wurden

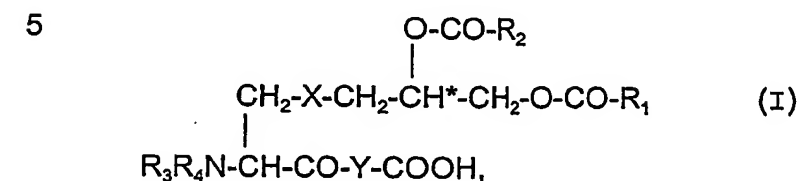
- 30 -

- Serumproben genommen und bei - 20 °C bis zur Bestimmung β -gal-spezifischer Antikörper gelagert. 96-muldige Nunc-Immuno MaxiSorp® Testplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) wurden beschichtet mit 100 μ l β -gal zu 5 μ g/ml in 0,05 M Carbonatpuffer (pH 8,2) pro Mulde. Es wurden serielle zweifache Verdünnungen der
- 5 Seren oder Lavagen in PBS mit 1 % BSA und 0,05 % Tween 20 zugegeben (100 μ l/Mulde), und die Platten wurden 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurde biotinyliertes γ -Ketten-spezifisches Ziege-anti-Maus IgG (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben, und die Platten wurden eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurde den Zellen
- 10 100 μ l peroxidasekonjugiertes Streptavidin (Pharmingen) zugegeben, und die Platten wurden 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach vier Waschvorgängen wurden Reaktionen mit ABTS in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,35), der 0,01 % H_2O_2 enthielt, entwickelt. Die Endwert-Titer wurden als die reziproken logarithmischen \log_2 -Werte der letzten Verdünnung ausgedrückt, was nach 30 Minuten Inkubieren
- 15 eine optische Dichte bei 405 nm von 0,1 Einheiten über den Werten der Negativkontrollen ergab. Immunantworten gegen β -gal wurden nur bei Tieren beobachtet, die mit MALP-2 als Schleimhautadjuvans immunisiert bzw. geimpft worden waren (siehe Fig. 12).
- 20 Es ist zu erwarten, dass auch bei unterschiedlichen Dosierungen Immunreaktionen sowohl in den Körperflüssigkeiten als auch in den Zellen hervorgerufen werden, welche wirksamer sind, als die von der alleinigen Verabreichung des Antigens hervorgerufenen. Darüber hinaus sind antigenspezifische Schleimhautreaktionen zumindest lokal in den Därmen (d.h. das Vorhandensein von antigenspezifischem
- 25 sekretorischen IgA in Darmausspülungen) festzustellen. Außerdem ist zu erwarten, dass sekretorische Reaktionen in entfernten Schleimhäuten festgestellt werden können.

- 31 -

Patentansprüche:

1. Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins der Struktur (I)



wobei

R_1 und R_2 , die gleich oder voneinander verschieden sein können, für C_{7-25} -Alkyl, C_{7-25} -Alkenyl oder C_{7-25} -Alkynyl,

X für S, O oder CH_2 ,

15 R_3 und R_4 unabhängig voneinander für H oder Methyl und

Y für eine aus 1 bis 25, vorzugsweise 12 bis 25 Aminosäureresten bestehende physiologisch verträgliche und in der verwendeten Spezies nicht per se immunogene Aminosäuresequenz stehen,

20 und das mit * markierte asymmetrische Kohlenstoffatom gemäß der Regel von Cahn-Ingold-Prelog die absolute R-Konfiguration hat, wenn X = S (Schwefel) ist,

als Mukosal-Adjuvans bei therapeutischer oder prophylaktischer Vakzinierung über die Schleimhäute.

25 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminosäuresequenz Y vorzugsweise ausgewählt ist aus.

a) GQTNT

b) SKKKK

c) GNNDESNISFKEK

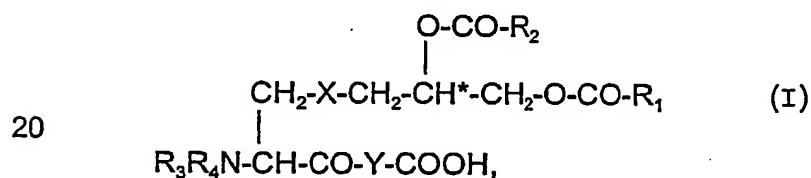
30 d) GQTDNNSQSAAPGSGTTNT,

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipoprotein oder Lipopeptid gemäß Struktur (I) ein S-[2,3-Bispalmitoyloxy-(2R)-propyl] cysteinyl-peptid ist, wobei das Peptid eine aus 1 bis 25 Aminosäureresten

- 32 -

bestehende physiologisch verträgliche, in der verwendeten Spezies vorzugsweise nicht immunogene Aminosäuresequenz ist.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Mucosal-Adjuvans in einer Zubereitung mit der eigentlichen Vakzin-Komponente vorliegt, die für intranasale, intra-NALT, aerosoliert orale, intrarektale, conjunctivale, intravaginale oder intraurethrale Applikation oder eine Applikation in die Milchgänge der weiblichen Brust vorgesehen ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Mucosal-Adjuvans in einem Kit für die Co-Applikation mit einem Vakzin in die Milchgänge der weiblichen Brust, auf intranasalem, intra-NALT, aerosoliert oralem, intrarektalem, conjunctivalem, intravaginalem oder intraurethralem Wege vorliegt.
6. Verwendung eines Lipopeptids oder Lipoproteins der allgemeinen Struktur (I)



wobei

- R_1 und R_2 , die gleich oder voneinander verschieden sein können, für C_{7-25} -Alkyl, C_{7-25} -Alkenyl oder C_{7-25} -Alkynyl,
- X für S, O oder CH_2 ,
- R_3 und R_4 unabhängig voneinander für H oder Methyl und
- Y für eine aus 1 bis 25 Aminosäureresten, vorzugsweise 12 bis 25 Aminosäureresten, bestehende physiologisch verträgliche und in der verwendeten Spezies nicht per se immunogene Aminosäuresequenz stehen, und das mit * markierte asymmetrische Kohlenstoffatom gemäß der Regel von Cahn-Ingold-Prelog die absolute R-Konfiguration hat, wenn $\text{X} = \text{S}$ (Schwefel) ist,

- 33 -

ausgenommen eines S-(2,3-Diacyloxypropyl)cystein-peptids der Sequenz DhcGNNDENISFKEK, wobei N-terminal die Aminosäuren an Positionen 2 und gegebenenfalls 3 fehlen und/oder C-terminal 1 bis 2 Aminosäuren deletiert sein können,

5

als Adjuvans bei einer nicht mukosalen Vakzinierung.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipopeptid oder Lipoprotein in einer Zubereitung mit wenigstens einem weiteren
10 Adjuvans und/oder Antigen vorliegt.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipopeptid oder Lipoprotein mit einem physikalischen oder biologischen Träger assoziiert oder verbunden ist.
15

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipopeptid oder Lipoprotein mit ein oder mehreren entzündungshemmenden, anti-angiogenen, cytotoxischen oder immunmodulatorischen Stoffen oder Liganden oder mit Antikörpern gemeinsam verabreicht wird oder in einer Zubereitung mit
20 diesen vorliegt.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Lipopeptid oder Lipoprotein in einer Zubereitung vorliegt, die weitere Zusatz- und Hilfsstoffe, insbesondere Konservierungsstoffe oder Stabilisatoren enthält.
25

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Vakzin, das durch das Adjuvans begleitet wird, in Form von Peptiden, Proteinen, DNA, Polysacchariden, Glycolipiden oder Glykoproteinen.

Fig. 1

Expression spezifischer Marker durch aus Knochenmark
gewonnenen murinen DCs nach Stimulation mit MALP-2 oder LPS

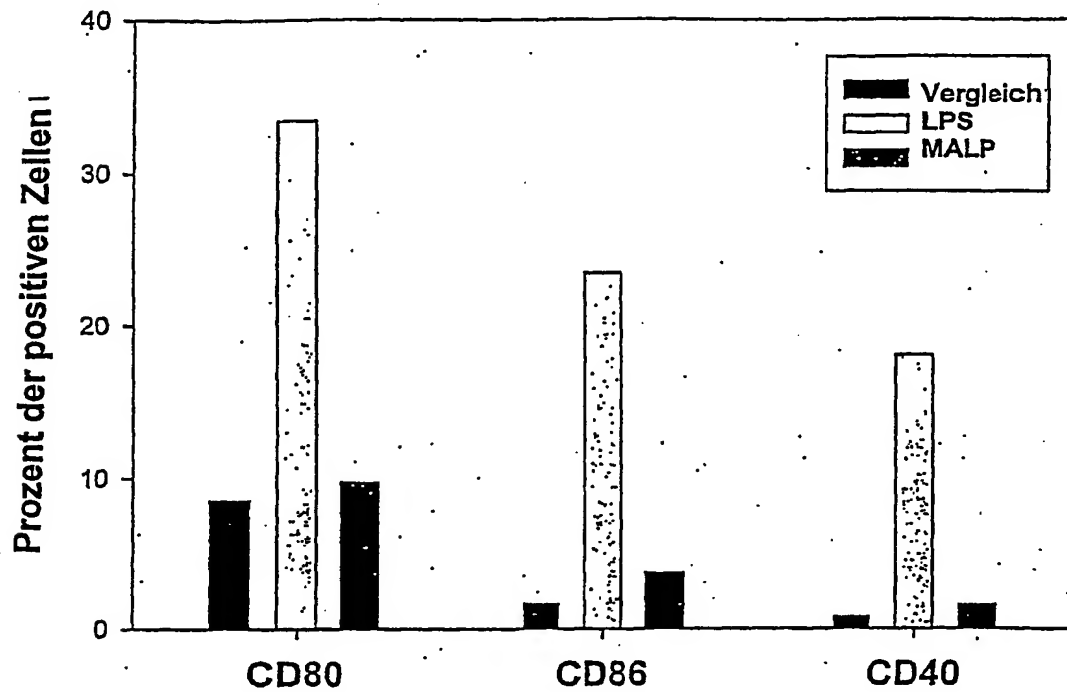


Fig. 2

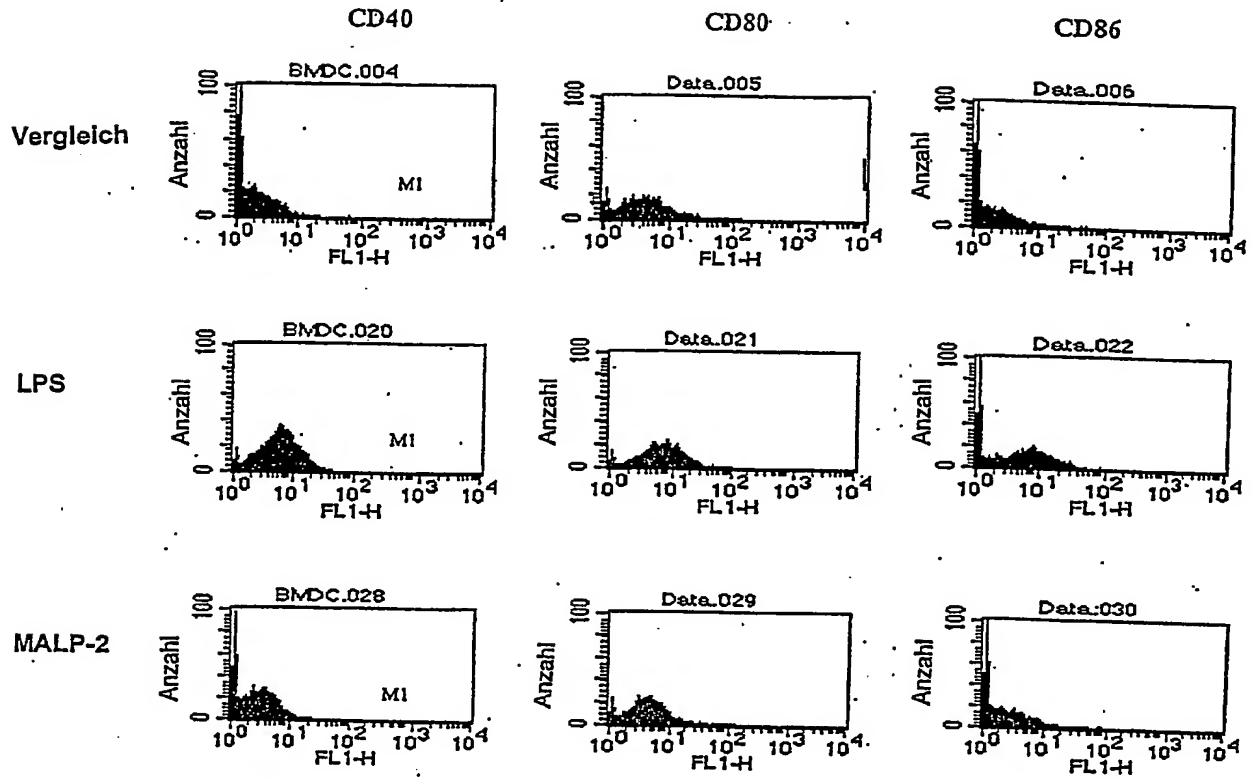


Fig. 3

β -galactosidspezifische Serum IgG Reaktion stimuliert
durch Verwendung von MALP-2 als Adjuvans

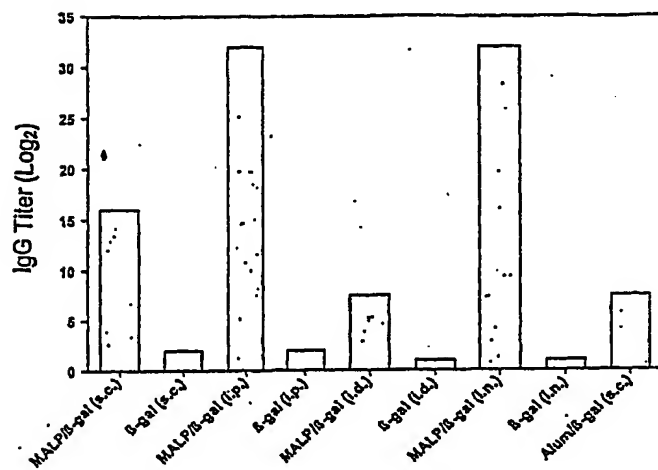


Fig. 4

β -galactosidasespezifische Serum IgG Reaktion stimuliert
durch Verwendung von 1 μ g MALP-2 als Adjuvans

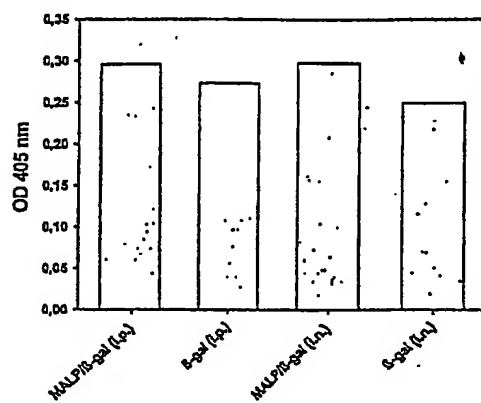


Fig. 5.

β -galactosidaspezifische proliferative Reaktionen stimuliert
durch Verwendung von MALP-2 als Adjuvans

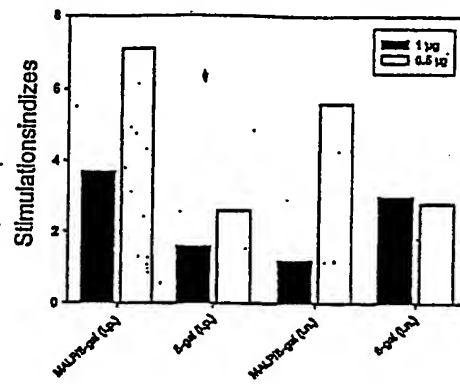


Fig. 6

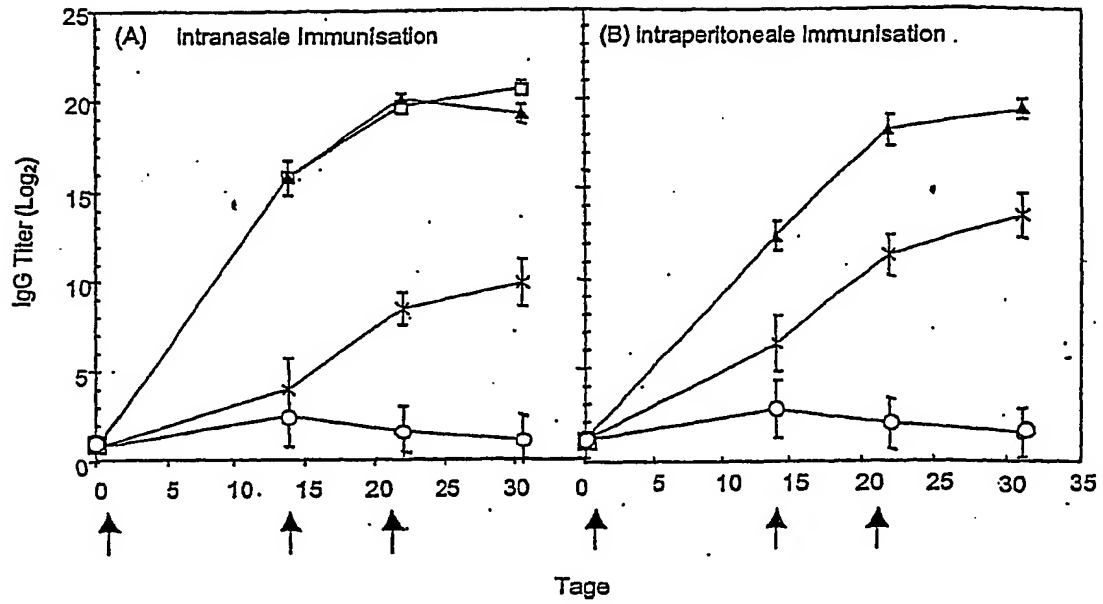


Fig. 7

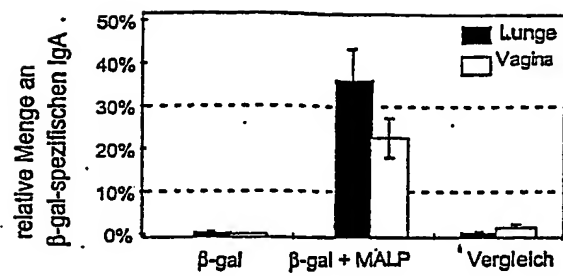


Fig. 8

Bestimmung des Serum IgE bei Tieren, die unter Verwendung
von MALP-2 als Adjuvans immunisiert wurden

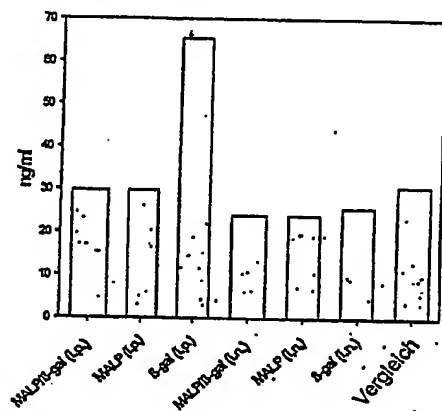


Fig. 9

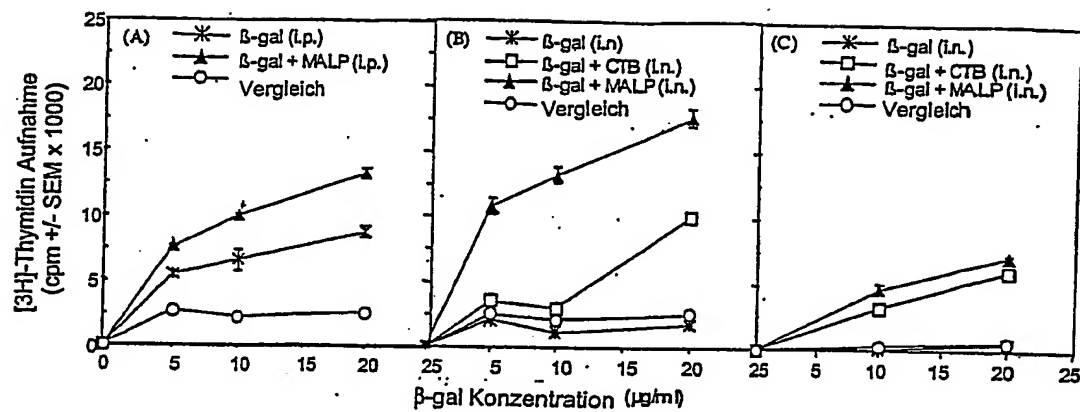


Fig. 10

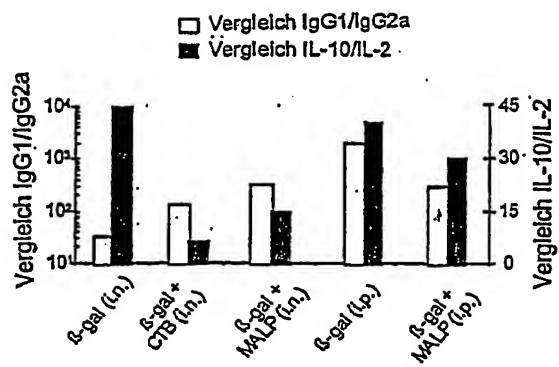


Fig. 11

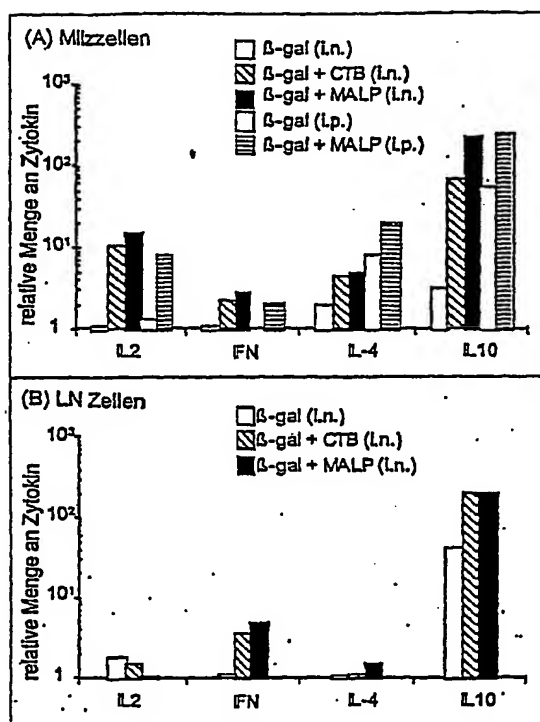
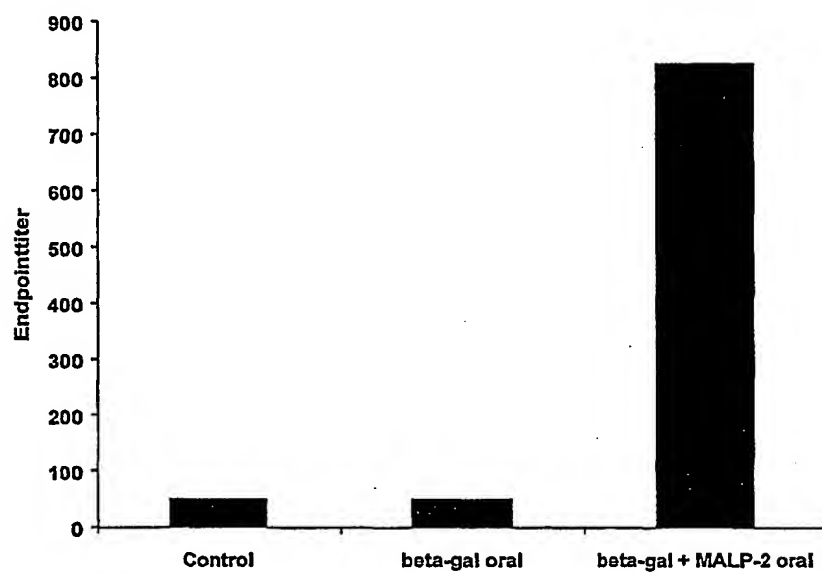


Fig. 12

 β -Galactosidase + MALP-2 ORALAnti β -Gal-IgG (day 30) :

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/39 A61P31/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 59610 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 25. November 1999 (1999-11-25) das ganze Dokument	1-11
A	WO 98 27110 A (GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG) 25. Juni 1998 (1998-06-25) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. September 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/09/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreau, J.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SHIBATA K ET AL: "The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of Mycoplasma salivarium is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) UNITED STATES 1 DEC 2000, Bd. 165, Nr. 11, 1. Dezember 2000 (2000-12-01), Seiten 6538-6544, XP002227431 ISSN: 0022-1767 das ganze Dokument	1-11
A	WO 93 22343 A (THE ROCKFELLER UNIVERSITY) 11. November 1993 (1993-11-11) das ganze Dokument	1-11
A	MUEHLRADT P F ET AL: "IDENTIFICATION OF S-(2,3-DIHYDROXYPROPYL)CYSTEIN IN A MACROPHAGE-ACTIVATING LIPOPEPTIDE FROM MYCOPLASMA FERMENTANS" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, Bd. 35, Nr. 24, 18. Juni 1996 (1996-06-18), Seiten 7781-7786, XP002070516 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument	1-11
X	MÜHLRADT P F ET AL: "Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from Mycoplasma hyorhinis." INFECTION AND IMMUNITY. OCT 1998, Bd. 66, Nr. 10, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 4804-4810, XP002254742 ISSN: 0019-9567 das ganze Dokument	1-11
P,X	RHARBAOUI FAIZA ET AL: "The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY. OCT 2002, Bd. 32, Nr. 10, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 2857-2865, XP002254743 ISSN: 0014-2980 das ganze Dokument	1-11

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
 Obwohl die Ansprüche 1-11 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)


Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die  Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/SA/97 03/03497

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9959610	A	25-11-1999	DE 19822820 A1 25-11-1999
		AT 245433 T 15-08-2003	
		AU 756107 B2 02-01-2003	
		AU 4264399 A 06-12-1999	
		CA 2328418 A1 25-11-1999	
		DE 59906362 D1 28-08-2003	
		WO 9959610 A2 25-11-1999	
		EP 1077717 A2 28-02-2001	
		JP 2002515446 T 28-05-2002	
WO 9827110	A	25-06-1998	DE 19652586 A1 18-06-1998
		WO 9827110 A2 25-06-1998	
		EP 0946590 A2 06-10-1999	
		US 6573242 B1 03-06-2003	
WO 9322343	A	11-11-1993	WO 9322343 A1 11-11-1993
		US 5580563 A 03-12-1996	